DOI:10.11931/guihaia.gxzw202406022

南酸枣转录组特征分析及 SSR 标记开发

徐梦阳[1,2]，蔡宇宇[1,2]，李婷[1,2]，吴南生[1,2]，孙荣喜[1,2*]

(1. 江西农业大学 林学院 南酸枣研究，南昌 330045；2. 江西农业大学 林学院 亚热带森林资源培育江西省重点实验室，南昌 330045)

摘　要：通过对南酸枣(*Choerospondias axillaris*)雌雄转录组特征分析及 SSR 标记开发，为其遗传评价和性别分子辅助育种提供理论支撑和科学依据。该文主要分析南酸枣转录组雌雄表达差异，SSR 位点的分布及序列特征，在此基础上开展 SSR 位点挖掘，并进行 SSR 引物的开发和有效性验证。结果表明：（1）南酸枣转录组测序共获得 40 341 条 Unigenes，总长度、N50、平均长度和 GC 含量分别为 52 806 369 bp、2 409 bp、1 309 bp 和 38.75%。共筛选到 1 949 个雌雄差异表达基因，其中雄株比雌株显著上调基因有 1 052 个，下调基因有 897 个。（2）在所有 Unigenes 中共检测到 5 251 个 SSR 位点，619 条 Unigenes 序列中含有 2 个及 2 个以上位点，SSR 发生频率为 11.18%，平均分布距离为 10.06 kb。在所有 SSR 位点中，二核苷酸重复所占比例最高(46.95%)，其次为三核苷酸重复(34.27%)。（3）经筛选及有效性验证共得到 20 对 SSR 多态性引物，在 85 份资源中共检测到 80 个等位基因，平均多态性信息含量(PIC)为 0.56。综上认为，南酸枣叶片转录组测序较高，组装效果较好。20 对多态性引物为后期遗传评价、性别辅助育种及指纹图谱构建提供参考。

关键词：南酸枣，引物开发，转录组，SSR，位点特征

中图分类号：Q943　　　　**文献标志码**：A

Transcriptome characteristic analysis and SSR marker development of *Choerospondias axillaris*

XU Mengyang[1,2], Cai Yuyu[1,2], LI Ting[1,2], WU Nansheng[1,2], SUN Rongxi[1,2*]

(1. *Institute of Choerospondias axillaris Research*, *College of Forestry, Jiangxi Agricultural University*, Nanchang 330045, China; 2. *College of Forestry, Jiangxi Agricultural University, Jiangxi Provincial Key Laboratory of Subtropical Forest Resources Cultivation*, Nanchang 330045, China)

Abstract: Transcriptome characteristic analysis and SSR markers was developed based on the leaf transcriptome sequences of *Choerospondias axillaris* in order to provide theoretical support and scientific basis for genetic evaluation, and sex marker-assisted breeding of *C. axillaris*. Differential expression of male and female transcriptomes, the distribution and sequence characteristics of SSR locus were analyzed, and SSR locus mining, development and validating were conducted based on the transcriptome data.The results were as follows：(1) A total of 40 341 Unigenes were obtained from the male and female transcriptomes of *C. axillaris*. The total length, the length of N50, average length and GC content were 52 806 369 bp, 2 409bp, 1 309 bp, and 38.75%, respectively. A total of 1 949 differentially expressed genes between males and females were screened, among them, 1 052 genes were significantly upregulated and 897 genes were

基金项目：国家自然科学基金(32160387)。

第一作者：徐梦阳(1999—)，硕士研究生，主要从事林木遗传育种研究，(E-mail)1240732369@qq.com。

[*]**通讯作者**：孙荣喜，博士，副研究员，研究方向为林木遗传育种及种质资源评价研究，(E-mail)rongxisun@163.com。

downregulated in male compared to female. (2) Among all Unigenes, 5 251 SSR loci were detected with 619 Unigenes containing two or more SSR loci, resulting in an SSR occurrence frequency of 11.18% and an average distribution distance of 10.06 kb. Among all SSR loci, dinucleotide repeats accounted for the highest proportion (46.95 %), followed by trinucleotide repeats (34.27 %). (3) A total of 20 pairs of SSR polymorphic primers were obtained, detecting 80 alleles among 85 samples, with an average polymorphism information content (PIC) of 0.56. In summary, the sequencing quality of *C. axillaris* is high, and the assembly effect is good. The 20 pairs of primers is found that had high suitability, which can provide reference for the analysis of population genetic diversity, sex marker-assisted breeding and fingerprints construction of *C. axillaris*.
Key words: *Choerospondias axillaris*, primer development, transcriptome, SSR, locus characteristics

南酸枣(*Choerospondias axillaris*)为漆树科(Anacardiaceae)南酸枣属植物，别名五眼果、广枣、人面子等，系蒙古族习用药材(中国科学院中国植物志编辑委员会，1980)。其树皮用于制备栲胶和鞣料、果实可食用或药用，并具有较高的材用价值(苏永精等， 2023；李若熙等，2023)。南酸枣广泛分布我国南方，是重要的速生造林树种，兼具经济、生态和社会效益(高阳等，2021；Zhang et al., 2022；杨观兰等，2022；李景恩等，2024)。此外，作为东亚特有单属植物，它是亚热带、热带落叶阔叶林的重要组成部分。古地理研究表明，南酸枣属植物可能起源于早始新世的欧洲，并沿温暖湿润的特提斯洋扩散到亚洲，东亚南酸枣属的分布格局形成可能出现于晚中新世之前(Liang et al., 2022)。东亚地区自渐新世以来有连续的南酸枣属化石记录，显示出较高的适应性。福建中新世的南酸枣化石，与现代南酸枣形态差异比较大，其中远古南酸枣形态比现代“子孙”更加多样(Wang et al., 2020)。南酸枣与漆树科的盐肤木属（*Rhus*）在分布范围情况上有相似之处，盐肤木属起源于早始新世的北美西部，在中始新世期间间断分布在亚洲和北美。研究认为(吴泽玲，2023)，亚洲东部特殊的地形及气候可能保留了这两个属。南酸枣很早就在欧洲消失，但在中国华南地区可能一直存在至今(Wang et al., 2020)。

南酸枣具有较强适应性，能在温度和降水变化较大的区域生长(李冬等，2020)。但由于地域气候不同，其表型性状、生长特性、营养成分、抗性以及物候期等方面存在较大变异，并在我国亚热带和热带地区长期进化中积累了丰富的种内遗传变异(叶学敏等，2019；尧云萍等，2021；买凯乐等，2022)。作为雌雄异株的南酸枣，其长期异交导致基因型高度杂合、缺乏同属物种参考以及丰富的分子标记，这限制了其遗传评价和分子辅助育种工作，不利于其进化潜力以及未来发展的分析，从而使其分子研究进展缓慢(吴谡琦等，2011；谷振军等，2019)。

物种的遗传多样性是其进化潜力和适应环境能力的重要指标，能为物种应用与开发提供理论依据(Magurran, 1988)。通过分子标记对物种进行遗传多样性分析，不仅对种质资源的收集、保存、评价和利用等提供重要借鉴，还为遗传学深层次研究奠定基础。叶金山等(2015)对南酸枣 ISSR 的 PCR 反应体系进行优化；谷振军等(2019)对南酸枣 SSR 分子标记进行初步探索；杨春霞等(2018)以南酸枣叶片和果实进行了转录组测序，获得大量数据；Zhang 等(2021)对南酸枣叶绿体全基因组进行测序，为进一步开展南酸枣分子遗传学研究奠定了基础。然而，目前发布的基因库中未查询到序列数据，分子标记序列信息也未明确报道，限制了南酸枣分子层面的遗传多样性研究。

微卫星分子标记作为目前应用最为广泛的分子标记之一，具有突变快、多态性和稳定性高、重复性好、分布广泛等优点，被广泛应用于遗传评价、品种鉴定、遗传图谱构建、QTL 定位、濒危物种保护等领域(Kuroda et al., 2006；阎毛毛等，2011)。通过不同分子标记检测物种多态性位点时，SSR 位点所提供的多态性通常远高于其他分子标记，可以更好地反映种群间和种群内的遗传分化和亚分化，提供更准确的物种进化信息。与其他分子标记相比，SSR 位点通常提供更高的多态性，更准确地反映种群间和种群内的遗传分化。郭晋宏等（2021）

通过 SSR 分析山西晋南漆树（*Toxicodendron vernicifluum*）群体，发现其群体内遗传多样性丰富，遗传变异主要集中在群体内部；任重等（2022）基于 SSR 分子标记研究了中国黄连木（*Pistacia chinensis*）的遗传多样性，发现其具有中等偏下的遗传分化，遗传分化主要集中在群体内部，划分为两个主要群体。由于南酸枣的分子生物研究起步较晚，缺乏基因组和相关序列信息，本研究利用南酸枣雌雄叶片的转录组数据，分析南酸枣雌雄表达差异，以及其转录组 SSR 位点的分布及序列特征，并在此基础上开发 SSR 标记引物，以期为其遗传多样性评价、雌雄性别标记开发以及指纹图谱构建等研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

转录组测序材料采自江西农业大学南酸枣种质资源圃，选取 10 年生(雌雄无性系各 3 株：Female-1、Female-2、Female-3、Male-1、Male-2、Male-3)南酸枣新鲜叶片经液氮速冻后，干冰保存送至检测公司进行转录组测序。采集江西崇义(JXCY)、贵州江口(GZJK)、湖南桑植(HNSZ)、云南芒市(YNMS)、广西平南(GXPN)、湖北赤壁(HBCB)、安徽祁门(AHQM)和重庆沙坪坝(CQSPB)8 个群体各 1 个样品作为引物筛选样品。引物多态性验证所用试验材料取自 3 个省份的 85 份样品（表 1）。所有南酸枣样本采其健康无病虫害嫩叶，经过硅胶迅速干燥之后保存用于 DNA 提取，最后进行引物筛选及多态性验证。

表 1 9 个南酸枣群体采样信息

Table 1 Sampling information of 9 *Choerospondias axillaris* populations

群体编号 Population code	群体名称 Sampling location	样品数量 Number of samples	经度 Longitude (E)	纬度 Latitude (N)
HNTY	湖南桃源 Taoyuan, Hunan	10	111°30′00″	28°54′36″
HNYS	湖南永顺 Yongshun, Hunan	10	109°51′36″	28°59′24″
HNXT	湖南湘潭 Xiangtan, Hunan	7	112°57′36″	27°46′48″
HBCY	湖北崇阳 Chongyang, Hubei	10	114°03′00″	29°33′36″
HBXA	湖北咸安 Xian'an, Hubei	10	114°16′48″	29°52′12″
HBCB	湖北赤壁 Chibi, Hubei	9	113°54′36″	29°43′48″
GXZS	广西钟山 Zhongshan, Guangxi	9	111°18′36″	24°31′48″
GXCW	广西苍梧 Cangwu, Guangxi	8	111°33′36″	23°51′00″
GXPN	广西平南 Pingnan, Guangxi	12	110°24′00″	23°33′00″

1. 2 试验方法

1.2.1 转录组组装及分析

对高通量测序获得的原始数据(raw data)进行过滤，获得高质量的有效数据(clean data)。利用 Trinity 软件（Grabherr et al., 2011）对过滤后的高质量数据进行无参基因组组装，获得转录本信息(Transcripts)及 Unigene 序列信息。以拼接得到的 Unigene 作为参考序列，将样品的有效序列(clean reads)与参考序列比对，得到 Read count。将 Read count 转换为 FPKM (Fragments Per Kilobase Million)，得到基因的表达水平。

1.2.2 SSR 位点挖掘与引物设计

使用 MISA 软件(http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/misa.html)对组装后的 Unigenes 进行搜索，寻找 Unigenes 中的 SSR 位点，设置单核苷酸至六核苷酸重复参数分别为 10 次、6 次、5 次、5 次、5 次和 5 次(潘丽芹等，2019)。对 SSR 位点的分布特征和重复类型进行统计分析。利用 Primer3.0(Rozen & Skaletsky，2000)软件进行批量引物设计，设置退火温度为 50~60 ℃， GC 含量在 40%～60%，引物长度在 18~27 bp，产物长度在 100~300 bp。选择 100

对雌雄差异表达基因所在位点设计的引物送武汉擎科生物科技有限公司进行合成。

1.2.3 基因组 DNA 提取及检测

采用 CTAB 法提取南酸枣基因组 DNA。用紫外分光光度计及 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度和质量。将条带清晰，纯度高、完整度好的 DNA 样品稀释至 50 ng·μL^{-1}，保存-20 ℃冰箱用于后续实验。

1.2.4 引物筛选验证和 PCR 扩增

首先，采用 1.5%琼脂糖凝胶电泳对 100 对引物进行初步筛选，随机选择 2 个样品进行 PCR 扩增，扩增产物符合预期范围、条带清晰且稳定的引物即为初筛合格引物。PCR 反应体系为 2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL，正反引物各 1 μL(10 μmol·L^{-1})，DNA 模板 1 μL，双蒸水 9.5 μL。采用 Touchdown 程序：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 30 s，63 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 45 s，10 个循环；94 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 45 s，20 个循环；72 ℃延伸 7 min，最后 4 ℃保存(孙荣喜，2017)。然后，选择 8 个较远群体中的 8 个样品，采用毛细管电泳测序对初筛合格的引物进行多态性复筛，筛选出峰值信号强，无杂峰的引物，作为复筛合格引物。最后，采用 9 个群体的 85 个样品对复筛合格的引物进行基于毛细管电泳测序的引物多态性验证。

毛细管电泳检测采用 3 条引物进行扩增：一条 5′端添加 M13 尾巴序列(5′-TGTAAAACGACGGCCAGT-3′)的正向引物、一条反向引物以及一条 5′端标有 HEX、MRA、FAM 和 ROX 荧光标记的 M13 尾巴引物。PCR 扩增采用两步法：第一步 PCR 采用 10 μL 反应体系：2×Taq PCR Master Mix 5 μL，10 μmol·L^{-1} M13 + F-primer 0.1 μL、10 μmol·L^{-1} R-primer 0.1 μL，DNA 模板 1 μL 和双蒸水 3.8 μL。PCR 扩增程序：95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 30 s，60 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s 共 20 个循环；72 ℃延伸 10min，于 4 ℃保存。第二步 PCR 采用 20 μL 反应体系：2×Taq PCR Master Mix 10 μL，10 μmol·L^{-1} M13 荧光标记尾巴引物(FAM、TAMRA、ROX)0.15 μL、10 μmol·L^{-1} 的 R-primer 0.15 μL 以及第一步得到的 PCR 扩增产物 2 μL 和双蒸水 7.7 μL。第二步 PCR 扩增程序：95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性、52 ℃退火及 72 ℃延伸分别 30 s，共 35 个循环；72 ℃延伸 10 min，保存至 4 ℃(孙荣喜，2017)。

1.2.5 毛细管电泳测序

将甲酰胺与分子量内标 GeneScan-500LIZ 按 100∶1 的体积混匀之后，取 10 μL 加入上样板，然后再加入 0.3 μL 的 PCR 产物，95 °C 变性 5 min，4 °C 冷却后离心，然后采用 ABI 3730xL DNA anaLyzer(Applied Biosystems，Foster，CA，USA)进行 2 重或 3 重毛细管电泳。

1.3 数据分析

对南酸枣转录组 SSR 位点分布特征进行统计分析，出现频率=搜索到的 SSR 总位点数/Unigenes 总序列数 SSR(黄建敏等，2019)。采用 GeneMaker2.2.0 软件(Lukashin & Borodovsky，1998)对收集的毛细管电泳原始峰图进行基因分型；采用 GenAIEx 6.5(Peakall & Smouse，2012)软件计算位点期望杂合度(H_e)、观测杂合度(H_o)、有效等位基因数(N_e)和等位基因数(N_a)等遗传参数。运用 PowerMarker V 3.25(Liu & Muse，2005)软件计算多态性位点信息含量(PIC)。

2 结果与分析

2.1 转录组数据组装分析

由表 2 可知，6 个样品的有效数据量均在 5.4 G 以上，总共获得 35.4 G 的有效数据，Q20 和 Q30 均高于 96.64%和 90.97%，GC 含量在 42%左右，表明测序质量较高。所有原始转录组数据已提交至 NCBI(PRJNA1142239)。雌株叶片测序(Female-1、Female-2、Female-3)分别获得 44 329 038 条、41 676 510 条和 40 128 104 条有效序列(clean reads)，雄株叶片测序(Male-1、Male-2 和 Male-3)分别获得 36 771 300 条、36 540 830 条和 37 214 014 条有效序列(clean reads)，共得到 236 659 796 条有效序列(clean reads)。

表 2 南酸枣转录组测序质量和数量

Table 2 Statistical data of transcriptome of *Choerospondias axillaris*

样品名称 Sample	原始数据 Raw data (G)	有效数据 Clean data (G)	有效序列 Clean reads	Q20 (%)	Q30 (%)	GC (%)
Female-1	6.67	6.63	44 329 038	97.42	92.63	42.81
Female-2	6.27	6.23	41 676 510	96.64	90.97	42.63
Female-3	6.03	6.01	40 128 104	97.28	92.15	42.64
Male-1	5.53	5.50	36 771 300	97.30	92.28	42.98
Male-2	5.50	5.47	36 540 830	96.90	91.52	42.90
Male-3	5.60	5.56	37 214 014	96.79	91.28	42.88

通过 Trinity 软件组装共得到 40 341 条 Unigenes 序列，总长度为 52 806 369 bp。平均长度为 1 309 bp，GC 含量为 38.75%。Unigenes N50 的数量和长度分别为 7 123 条和 2 409 bp，最大长度和最小长度分别为 16 889 bp 和 201 bp。其中，长度在 201~500 bp 范围内的占比为 38.38%，有 15 482 条；501~1 000 bp 范围内的占比为 20.75%，有 8 371 条；1 001~2 000 bp 范围内的占比为 17.62%，有 7 109 条；长度大于 2 000 bp 的占比为 23.25%，有 9 379 条。

将组装后的 Unigene 作为参考，统计每个样本中基因检测的情况（表 3）。6 个雌雄样品中共检测到 40 341 个基因，其中雌株可以比对总基因的比例在 72%以上，而雄株的比例只占 70%左右。

表 3 南酸枣雌雄样品基因数量

Table 3 Genes of male and female of *Choerospondias axillaris*

样品名称 Sample name	测序总基因 Sequenced total genes (占比 Proportion：%)
Female-1	30 402 (75.36%)
Female-2	30 256 (75.00%)
Female-3	29 167 (72.30%)
Male-1	28 353 (70.28%)
Male-2	28 531 (70.72%)
Male-3	28 531 (70.72%)
All	40 341 (100.00%)

2.2 差异基因表达分析

采用以 log10(FPKM + 1)值为基础的聚类分析方法，利用转录组测序结果进行表达量分析。将 6 个样品按雌雄分为两组，以错误发现率 *P* 值(*P* value)<0.05 和表达差异倍数|log2 FoldChange| >1 为筛选标准在南酸枣雌株和雄株叶片组间对比，最终筛选到 1 949 个差异表达基因，其中上调基因和下调基因分别有 1 052 个和 897 个（图 1）。

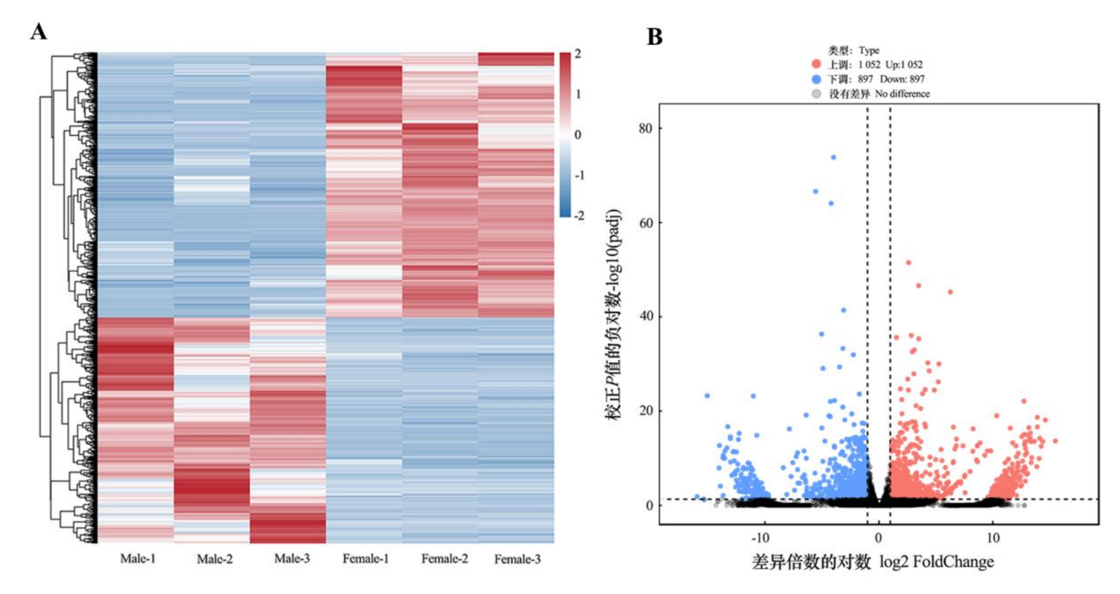


图 1 南酸枣整体差异基因聚类图(A)和差异表达基因火山图(B)

Fig.1 The overall differential gene cluster diagram (**A**) and differential expression gene volcano diagram (**B**) of *Choerospondias axillaris*

2.3 转录组 SSR 数量与分布

使用 MISA 软件对南酸枣的 40 341 条 Unigenes 进行检索后，共检测到 5 251 个 SSR 位点。这些 SSR 位点分布在 4 511 条 Unigenes 中，SSR 的出现频率为 13.02%，发生频率为 11.18%。在这些 Unigenes 中，含有单个 SSR 位点的有 3 892 条，含有 2 个及以上的 SSR 位点有 619 条，含有复合 SSR 位点的有 386 条。此外，有 18 条 Unigenes 中复合 SSR 位置出现重叠(表 4)。

表 4 南酸枣转录组 SSR 位点的信息

Table 4 Information of SSR loci in the transcriptome of *Choerospondias axillaris*

项目类型 Project type	统计结果 Statistical result
检测的序列总数 Total number of detected sequences	40 341
检测序列总的大小 Detect the total size of the sequence (bp)	52 806 369
检测到的 SSR 位点总数 Total number of detected SSR loci	5 251
包含 SSR 位点的 Unigenes 数量 Number of Unigenes containing SSR loci	4 511
含有单个 SSR 位点的 Unigenes 数量 Number of Unigenes with a single SSR locus	3 892
含有 2 个及以上 SSR 位点的 Unigenes 数量 Number of Unigenes with 2 or more SSR loci	619
含复合型 SSR 的 Unigenes 数量 Number of Unigenes containing composite SSR loci	386
含有位置有重叠的复合 SSR 的 Unigenes 数量 Number of Unigenes containing overlapping composite SSR	18

除单核苷酸重复外，二核苷酸重复类型最为常见，占 SSR 位点总数的 42.93%，平均分布距离为 23.43 kb。其次是三核苷酸和四核苷酸重复类型，分别占比 31.06%和 11.52%，平均分布距离分别为 32.38 kb 和 87.28 kb。五核苷酸和六核苷酸重复类型占比较小，分别为 3.52%和 3.28%，平均分布距离分别为 285.44 kb 和 307.01 kb。各种核苷酸重复类型的平均分布距离存在较大差异。

在 Unigenes 序列中，二核苷酸重复出现频率最高，达到 5.59%，其次是三核苷酸重复，为 4.04%。四核苷酸、五核苷和六核苷酸重复类型的出现频率较低，分别为 1.50%、0.46%

和 0.43%。复合型核苷酸和位置有重叠的复合型核苷酸重复的占比（7.35%、0.34%）与出现频率（0.96%、0.04%）均较低。

SSR 位点序列长度总长为 117 134.87 bp，其中二核苷酸重复类型的 SSR 长度最长，为 41 248.20 bp，其次是三核苷酸重复类型(29 472.17 bp)，四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸重复类型的 SSR 长度分别为 10 545.15 bp、3 975.65 bp、4 434.16 bp。除去复合型核苷酸和位置有重叠的复合型核苷酸重复类型，六核苷酸重复类型的平均长度最长，但是占比较小(3.28%)。所有 SSR 位点的平均长度为 22.31 bp(检测到的序列总长度与搜索到的 SSR 数量之比)，平均每 10.06 kb(检测序列总的大小与搜索到的 SSR 数量之比)就会有 1 个 SSR 位点出现(表 5)，其中检测序列总的大小见表 4（52 806 369 bp）以及 1 kb=1 000 bp。

表 5 南酸枣转录组 SSR 各重复类型的分布特征

Table 5 Distribution characteristics of SSR repeat types in the transcriptome of *Choerospondias axillaris*

SSR 类型 SSR type	数目 Number	比例 Proportion (%)	频率 Frequency (%)	总长度 Total length (bp)	平均长度 Average length (bp)	平均距离 Average distance (kb)
p2	2 254	42.93	5.59	41 248.20	18.30	23.43
p3	1 631	31.06	4.04	29 472.17	18.07	32.38
p4	605	11.52	1.50	10 545.15	17.43	87.28
p5	185	3.52	0.46	3 975.65	21.49	285.44
p6	172	3.28	0.43	4 434.16	25.78	307.01
c	386	7.35	0.96	26 645.58	69.03	136.80
c*	18	0.34	0.04	813.96	45.22	2 933.69
总计 Total	5 251	100	13.02	117 134.87	22.31	10.06

注：**p2**. 二核苷酸；**p3**. 三核苷酸；**p4**. 四核苷酸；**p5**. 五核苷酸；**p6**. 六核苷酸；**c**. 复合型核苷酸；**c***. 位置有重叠的复合型核苷酸。

Note: **p2**. Dinucleotide; **p3**. Trinucleotide; **p4**. Tetranucleotide; **p5**. Pentanucleotide; **p6**. Hexanucleotide; **c.** Complex nucleotides; **c***. Position overlap of complex nucleotides.

2.4 转录组 SSR 位点的基序长度及重复基元特点

基序长度在 20 bp 以下的 SSR 位点共有 3 601 个，所占比例最高，为 68.58%；其次为长度在 21~30 bp 的 SSR 位点，有 1 112 个，占比为 21.18%；长度在 30 bp 以上的总占比较小，仅占 10.24%。

5 251 个 SSR 位点中含有 412 种重复基元类型。其中，二核苷酸重复有 10 种，以 AG/CT 为主要类型，为 1 309 个，频率为 24.93%；其次是 AT/AT 类型，有 730 个，频率为 13.90%。三核苷酸重复有 60 种，主要以 AAG/CTT 为优势类型，共 556 个，频率为 10.59%；其次是 AAT/ATT 类型，有 277 个 ，频率为 5.28%。四核苷酸重复有 95 种，AAAT/ATTT 类型最多，有 312 个，频率为 5.94%；其次是 AAAG/CTTT 类型，有 103 个，频率为 1.96%。五核苷酸重复有 99 种，以 AAAAT/ATTTT 为主要类型，共有 53 个，频率为 1.01%。此外，六核苷酸重复共有 148 种、复合型重复基元有 404 种，位置重叠的复合型重复基元有 18 种，但出现频率都很低，频率都在 0.5%以下(图 2)。

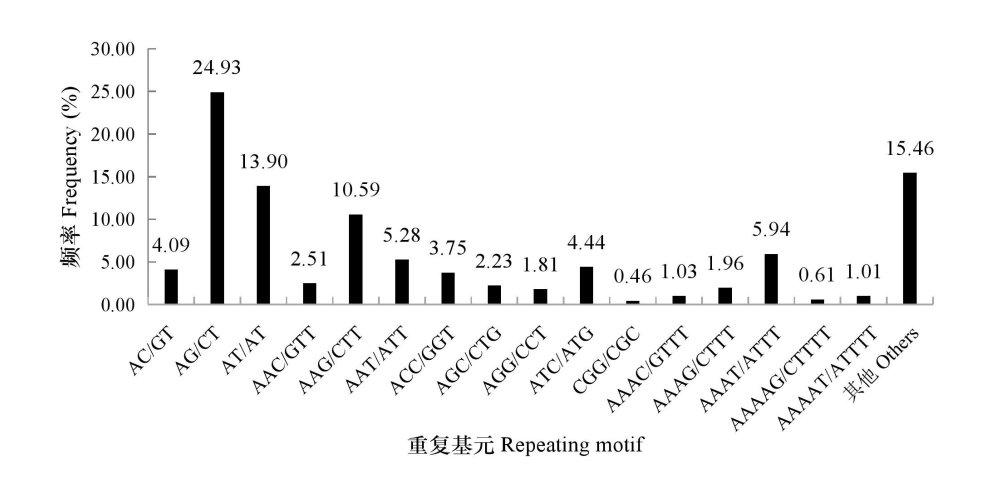


图 2 南酸枣转录组中不同重复基元下 SSR 分布

Fig. 2 SSR distribution under different repeat motifs in the transcriptome of *Choerospondias axillaris*

2.5 南酸枣转录组中 SSR 重复次数

去掉复合型位点，在 2~6 SSR 基序重复次数分布在 4~29 之间，最常见的是 6 个串联重复(1 100)，占总数的 22.69%。其次是 5 个串联重复(1 057)和 4 个串联重复(727)，分别占总数的 21.81%和 15.00%。二核苷酸以 6 次串联重复为主，三核苷酸以 5 次串联重复为主，四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸以 4 次串联重复为主(表 6)。随着重复次数的增加，SSR 数量逐渐减少。

表 6 不同重复次数 SSR 的核苷酸类型的数量及占比

Table 6 Number and proportion of nucleotide types of SSR with different repetition types

重复类型 Repetitive type	重复单元数量 Number of repeating units												总计 Total	比例 Proportion (%)
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	≥15		
二核苷酸 Dinucleotide	0	0	703	377	251	191	130	124	86	65	84	243	2 254	46.95
三核苷酸 Trinucleotide	0	873	364	193	84	51	34	6	9	5	3	9	1 631	34.27
四核苷酸 Tetranucleotide	450	120	22	8	2	1	0	1	0	1	0	0	605	11.64
五核苷酸 Pentanucleotide	142	34	8	0	0	1	0	0	0	0	0	0	185	3.64
六核苷酸 Hexanucleotide	135	30	3	3	0	0	1	0	0	0	0	0	172	3.50
总计 Total	727	1 057	1 100	581	337	244	165	131	95	71	87	252	4 847	100.00
比例 Proportion (%)	15.00	21.81	22.69	11.99	6.95	5.03	3.41	2.70	1.96	1.47	1.79	5.20	100.00	—

2.6 引物筛选与有效性验证

2.6.1 引物初筛与复筛

在 100 对 SSR 引物中，初筛共有 55 对引物成功扩增出预期的清晰条带，扩增成功率为 55%(24 对电泳结果见图 3)。经毛细管电泳复筛，发现 20 对引物表现出较高多态性，在有效

引物中占比 36.36%，其中引物 NSZ-9141 检测结果见图 4。

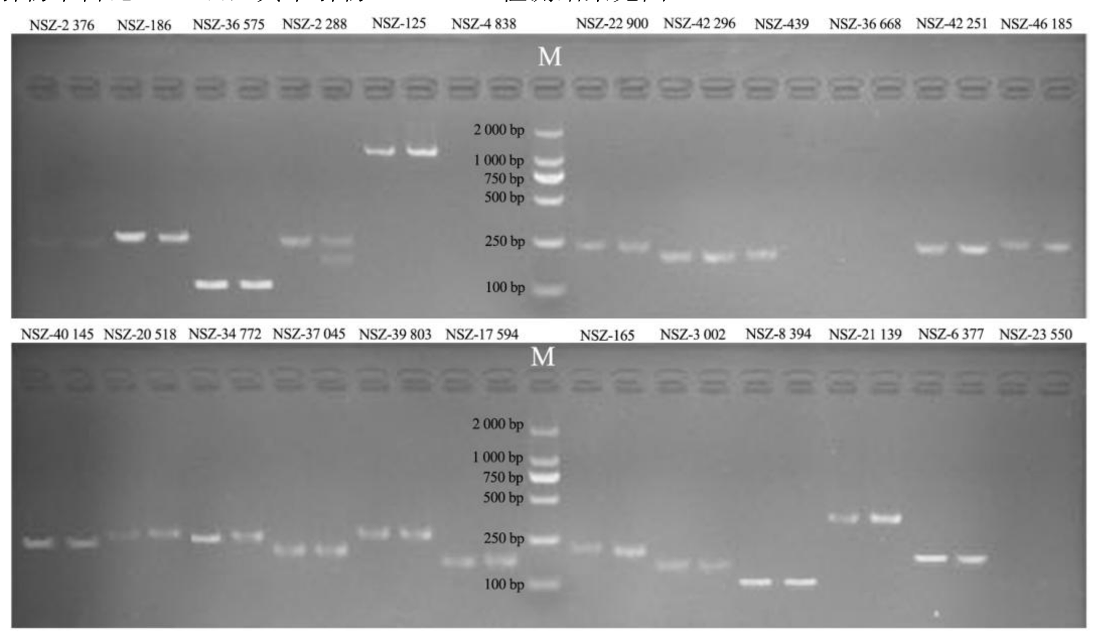
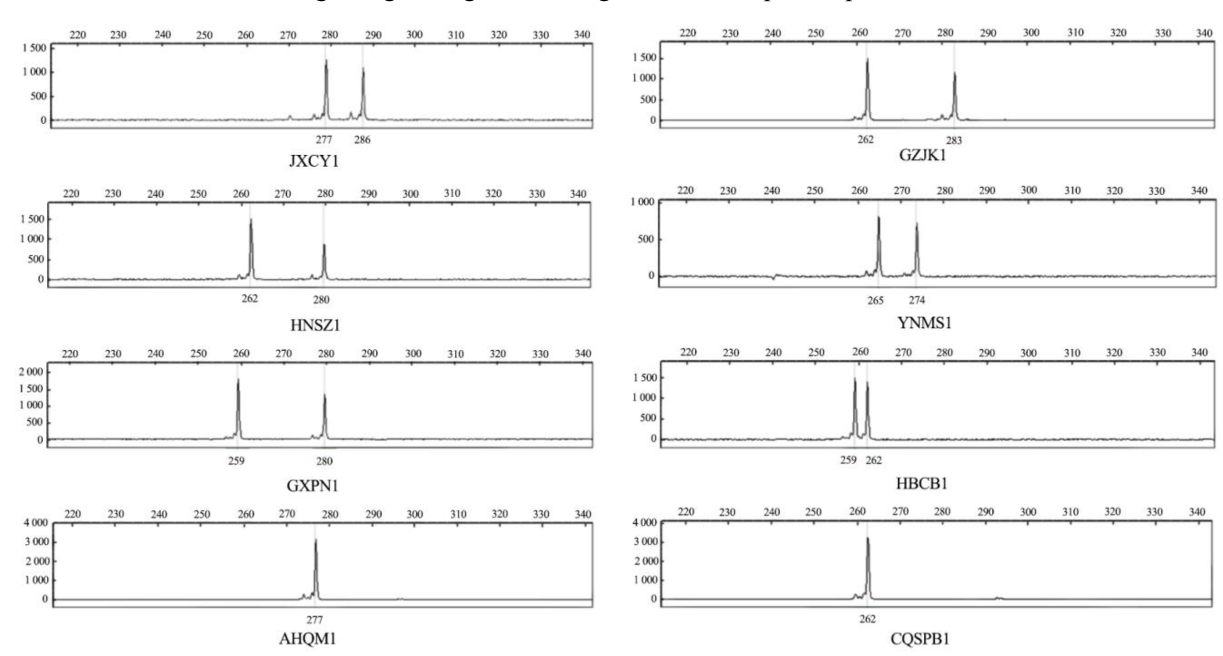


图 3 24 对 SSR 引物琼脂糖电泳初筛结果

Fig. 3 Agarose gel screening results of 24 primer pairs



横轴和纵轴分别表示片段大小(bp)和荧光强度；**JXCY**. 江西崇义；**GZJK**. 贵州江口；**HNYS**. 湖南永顺；**YNMS**. 云南芒市；**GXYS**. 广西阳朔；**HBCB**. 湖北赤壁；**AHQM**. 安徽祁门；**CQSPB**. 重庆沙坪坝。

The *X*-axis and *Y*-axis indicates fragment size (bp) and fluorescence intensity, respectively; **JXCY**. Chongyi, Jiangxi; **GZJK**. Jiangkou， Guizhou; **HNYS**. Yongshun, Hunan; **YNMS**. Mangshi, Yunnan; **GXYS**. Yangshuo, Guangxi； **HBCB**. Chibi, Hubei; **AHQM**. Qimen, Anhui; **CQSPB**. Shapingba, Chongqing.

图 4 引物 NSZ-9141 在 8 份南酸枣中扩增出的 8 种基因型

Fig.4 Eight genotypes generated by the primer NSZ-9141 amplified among eight samples of *Choerospondias axillaris*

2.6.2 SSR 位点群体遗传分析有效性验证

利用湖北、湖南、广西 9 个群体的 85 个南酸枣样品对 20 对引物进行有效性验证。表 7 结果显示，共检测到 80 个等位基因(N_a)，平均每对引物检测到 3.82 个等位基因；平均有效等位基因数(N_e)为 2.61，其变化范围在 1.14(NSZ-22900)～7.16(NSZ-131)之间；多样性指数(I)分布在 0. 21(NSZ-22900)～2.06(NSZ-131)之间，平均值为 0.98；平均观测杂合度(H_o)以及期望杂合度(H_e)值为 0.53。多态性信息含量(PIC)在 0.12(NSZ-22900)～0.92(NSZ-131)之间，平均值为 0.56。其中，15 个位点具有高度多态性(PIC > 0.5)，4 个位点具有中度多态性(0.25 < PIC ≤0.5)。结果表明开发的 20 对 SSR 引物可用于后续南酸枣分子遗传多样性评价。

表 7 20 对多态性引物序列信息

Table 7 Sequence information of 20 pairs of polymorphic SSR markers of *C.axillaris*

引物 Primer	引物序列 (5′-3′) Primer sequences (5′-3′)	重复单元 Repeat motif	片段大小 Fragment size（bp）	N_a	N_e	I	H_o	H_e	PIC
NSZ-43385	F：CATCCATAGAATTTGGAGTCTGC R：CAAAAAGTGCTCCAGCATCA	(AG)14	189	1.89	1.53	0.45	0.33	0.30	0.29
NSZ-9141	F：TCGTTGCTTGTAAGCTGAGTG R：AGTGTCCTCGCCTCTGAAAC	(CTT)8	241	4.33	2.63	1.14	0.49	0.61	0.63
NSZ-37910	F：CCAAGGCTTCAACATCACAA R：AACAACCAGCATTGCACATT	(GA)10	277	2.89	2.13	0.85	0.42	0.51	0.57
NSZ-240	F：TGATACGGTGGCTGTGTGAG R：TCACCATATCATGCACCAGC	(GA)7	168	3.33	1.62	0.66	0.41	0.34	0.35
NSZ-22900	F：AACATGTTGATAACAGACTTGAAAAG R：ATGATGGAAGTTGGCACTCC	(GAT)6	227	1.78	1.14	0.21	0.06	0.11	0.12
NSZ-39803	F：GAAATAAGCAATTGGGTTTGGA R：GGAACCCTGGCATGAACTAC	(AG)11	280	3.56	2.51	1.01	0.48	0.58	0.61
NSZ-42088	F：CACCAGGGCCTCAACTAGAC R：AATCTTCACGGCCGTACATC	(AT)8	143	5.11	2.61	1.17	0.43	0.58	0.61
NSZ-165	F：CAGAACAGGGGAGGCATAAA R：TGGAAACATTATCAAGCGCA	(AG)10	207	5.44	3.41	1.41	0.41	0.70	0.81
NSZ-26522	F：CCACTTCTCCATCTATCAACTAACC R：CTGGAAGCGTCCATTACACA	(CT)11	272	3.11	2.35	0.92	0.43	0.57	0.52
NSZ-39039	F：TCCACCATCGCTTCCTCTAC R：GCTTTGTGGGGTTGAATTGT	(CCATCT)4	171	2.67	1.78	0.64	0.52	0.37	0.39
NSZ-41051	F：TCCTGCATCAACAACAAATGA R：CCCATCATTTCAAATCCAACA	(GAGGTT)5	198	2.89	2.03	0.80	0.33	0.46	0.52
NSZ-1007	F：TAAGTTCGCATCGGTGTTTG R：GGACTCACCATTCCCAACTC	(TAAAA)4	264	2.00	1.63	0.51	0.13	0.34	0.33
NSZ-36575	F：CTCTCGAGACAATACCCGGA R：CGTGTATAGCTCGTGAATGGAA	(CT)12	120	4.78	3.00	1.22	0.63	0.62	0.72
NSZ-37045	F：AGCACAGGTCAAATTTTGGAA R：AATTTGGGGTCACTTGTCCA	(AAAAAG)4	203	2.56	2.11	0.80	0.30	0.51	0.53
NSZ-45650	F：GGATGCATCAAAAAGGGAAA R：CTTTGTGGCCAATTTGGAGT	(ACCAGC)4	268	2.67	2.02	0.80	0.42	0.50	0.56
NSZ-131	F：ATGACTGGCGGCTACTGATT R：GCCGACAATCCACTGCTAAT	(AG)9	171	3.78	2.75	1.13	1.00	0.63	0.63

NSZ-187	F：GTGGAGGAAACCAAAGGACA R：CAAAGATGAGATGATCCACCA	(TA)8	172	4.89	3.54	1.36	1.00	0.70	0.70
NSZ-173	F：CTTGGGTCCCTGCACTACTC R：TGGGACCCATAATCGTTGTT	(AG)11	227	4.00	2.72	1.12	0.81	0.61	0.69
NSZ-186	F：CGGTCATGCCTGAAGTAACA R：CAAGCCCTGAATCGTCTAGTG	(TA)6	173	9.56	7.16	2.06	1.00	0.84	0.92
NSZ-125	F：CCATCAAAGAAGGGGACGTA R：ACCATTTCACCCACATGTCA	(GT)6	130	5.11	3.53	1.39	1.00	0.71	0.79
均值 Mean				3.82	2.61	0.98	0.53	0.53	0.56

注：N_a. 等位基因数；N_e. 有效等位基因数；I. Shannon's 信息指数；H_o. 观测杂合度；H_e. 期望杂合度；**PIC**. 多态信息含量。

Note：N_a. Number of alleles; N_e. Number of effective alleles; I. Shannon's information index; H_o. Observed heterozygosity; H_e. Expected heterozygosity; **PIC**. Polymorphic information content.

3 讨论

对于没有参考基因组的非模式物种，基于转录组数据开发分子标记被认为是最有效的方法(Unamba et al.，2015)。本研究基于南酸枣雌雄叶片转录组，共获得 236 659 796 条有效序列，N50 长度为 2 409 bp，平均长度为 1 309 bp，高于同漆树科植物芒果(*Mangifera indica*)(N50=2 160 bp；平均长度=1 219 bp)(丁雨格等，2024)。此外，也高于其他学者有关南酸枣叶片及果实的转录组测序结果(N50=1 841 bp；平均长度=1 287 bp)(谷振军等，2019)以及同为长江以南主要阔叶树种的米槠(*Castanopsis carlesii*)(N50=1 427 bp；平均长度=1 034 bp)(Zhong et al.，2023)和同样果用价值较高的苦楝(*Melia azedarach*)(N50=1 955 bp；平均长度=1 431.82 bp)(蔡金峰等，2021)的测序结果。这说明研究所获得的南酸枣转录组测序质量以及组装效果较好，为南酸枣的分子标记开发奠定良好的信息基础。

本研究从南酸枣叶片转录组序列中检测到 5 251 个 SSR 标记位点，平均分布距离为 10.06 kb，SSR 发生频率为 11.18%。发生频率低于南酸枣果实及叶片转录组中的发生频率 25.52%(谷振军等，2019)。但南酸枣 SSR 的发生频率高于枇杷(*Eriobotrya japonica*)(6.77%)(郑婷婷等，2015)和芒果(7.57%)(罗纯等，2015)等植物，这表明不同物种之间 SSR 出现频率存在差异(Zalapa et al.，2012)。不同测序组织类型选择、基因表达量的差异、SSR 位点搜索标准的不一致以及 Unigenes 数量、长度和序列大小的差异可能是导致这种差异产生的原因。不同植物的 SSR 位点重复单元类型各异，多数植物如杨梅(*Myrica rubar*)(张淑文等，2019)、芒果(罗纯等，2015)、白三叶(*Trifolium repens*)(张婷婷等，2019)等都以二核苷酸、三核苷酸重复为主。本研究中二核苷酸重复所占比例最高(46.95%)，其次为三核苷酸重复(34.27%)。这两种重复基序所占比例高达 81.22%，与大多数物种重复单元类型相同。但也有植物以单核苷酸重复为主，如枸杞(*Lycium chinense*)(王佳伟等，2022)、悬铃木(*Platanus acerifolia*)(张思思等，2022)等。然而，由于单核苷酸自身的特殊性，大多数研究中不将其作为研究对象，因此在本研究中不考虑单核苷酸重复。

多态性是鉴定分子标记性能的重要参考指标之一。研究发现，SSR 长度是影响其多态性的重要因素(Temnykh et al.，2000)。具有高度多态性的 SSR 长度通常大于 20 bp，中多态性的 SSR 长度多在 12~20 bp 之间，低多态性的 SSR 长度在 12 bp 以下。南酸枣 SSR 位点长度在多在 21~30 bp 之间，共有 1 112 个，表明南酸枣的 SSR 位点具有高多态性潜能。本研究开发的 20 对引物，在 9 群体共检测到 80 个等位基因，平均观测杂合度以及期望杂合度均值均为 0.53，平均多态性信息含量为 0.56，其中 19 个位点具有中、高多态性，说明开发的 SSR 引物能够满足后续相关研究需求。通常认为，重复基序长度与选择压力相关，短重复基序变

异速率越快，低级重复单元类型的 SSR 多态性高于高级重复单元类型(Zhang et al.，2005)。单碱基、二碱基和三碱基等低级重复基元通常具有较长的进化时间和较高的变异频率(陈亮等，2022)。除单核苷酸外，南酸枣主要以二核苷酸重复为主，表明其具有相对较高的进化程度。在福建地区发现的中新世南酸枣化石，经研究后发现其在中国华南地区可能自远古时代就一直存在至今，具有悠久的演变历史(Wang et al.，2020)。南酸枣在此过程中保持一定进化速率的同时，表现出对环境较高的适应性，可能与南酸枣较高的多态性特性有关。

4 结论

南酸枣转录组数据的 SSR 发生频率为 11.18%，低级重复基元通常具有较长的进化时间和较高的变异频率，主要以二核苷酸、三核苷酸重复为主。20 对引物经多态性验证，共检测到 80 个等位基因，平均多态性信息含量为 0.56。表明这 20 对引物可有效用于后续南酸枣遗传多样性评价、性别分子辅助育种、指纹图谱构建以及核心种质构建等的相关研究中。

参考文献：

CAI JF, YANG XM, YU WW, et al., 2021. Development of SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of *Melia azedarach* [J]. Scientia Silvae Sinicae, 57(6): 85-92. [蔡金峰，杨晓明，郁万文，等，2021. 基于苦楝转录组测序的 SSR 分子标记开发 [J]. 林业科学，57(6)：85-92.]

CHEN L, YU FL, YAO MZ, et al., 2008. Preparation of the UPOV guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability——tea plant [J]. Scientia Agricultura Sinica, 41(8): 2400-2406. [陈亮，虞富莲，姚明哲，等，2008. 国际植物新品种保护联盟茶树新品种特异性、一致性、稳定性测试指南的制订 [J]. 中国农业科学，41(8)：2400-2406.]

DING YG, HOU Q, ZHOU L, et al., 2024. Transcriptome analysis of the effects of foliar water application on the nap time of mango leaves [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 44(7): 1094-1104. [丁雨格，侯琪，周玲，等，2024. 叶面喷水影响芒果叶片“午休”的转录组分析 [J]. 西北植物学报，44(7)：1094-1104.]

Editorial Committee of Flora of China, Chinese Academy of Sciences, 1980. Flora Reipublicae Popularis Sinicae: Vol. 45, Part one [M]. Beijing: Science Press: 86. [中国科学院中国植物志编辑委员会，1980. 中国植物志：第四十五卷，第一分册 [M]. 北京：科学出版社：86.]

GAO Y, BA YF, LI HY, et al., 2021. Changes of color and texture of *Choerospondias axillaris* fruit at different storage temperatures [J]. Non-wood Forest Research, 39(4): 239-245. [高阳，巴元富，李宏宇，等，2021. 不同贮藏温度条件下南酸枣果实色泽和质地的变化 [J]. 经济林研究，39(4)：239-245.]

GU ZJ, YANG CX, DING W, et al., 2019. Characterization analysis of SSR sequences in the transcriptome of *Choerospondias axillaris* and its molecular marker development [J]. South China Forestry Science, 47(3): 12-15. [谷振军，杨春霞，丁伟，等，2019. 南酸枣转录组 SSR 序列特征分析及其分子标记开发 [J]. 南方林业科学，47(3)：12-15.]

GUO JH, LIU SJ, WU YH, et al., 2019. Genetic structure of *Toxicodendron vernicifluum* in southern Shanxi Province based on SSR marker [J]. Molecular Plant Breeding, 17(9):

2950-2955.[郭晋宏，刘淑娇，武艳虹，等，2019. 基于 SSR 标记的山西晋南漆树种群遗传结构 [J]. 分子植物育种，17(9)：2950-2955.]

GRABHERR MG, HAAS BJ, YASSOUR M, et al., 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome [J]. Nature Biotechnology, 29(7): 644.

HUANG JM, LI F, LIU YJ, et al., 2019. Bioinformatic analysis of SSR information in *Tirpitzia sinensis* transcriptome [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 47(2): 54-58. [黄建敏，李菲，刘云静，等，2019. 青篱柴转录组数据 SSR 位点的生物信息学分析 [J]. 江苏农业科学，47(2)：54-58.]

KURODA Y, KAGA A, TOMOOKA N, et al., 2006. Population genetic structure of Japanese wild soybean (*Glycine soja*) based on microsatellite variation [J]. Molecular Ecology, 15(4): 959-974.

LI RX, ZHANG N, LUO XD, et al., 2023. Effects of different lactic acid bacteria fermentation on physicochemical indexes and functional components of *Choerospondias axillaris* beverage [J]. China Brewing, 42(6): 161-165. [李若熙，张楠，罗小丹，等，2023. 不同乳酸菌发酵对南酸枣饮料理化指标及功能成分的影响 [J]. 中国酿造，42(6): 161-165.]

LI JE, DONG JJ, XIE MZ, et al., 2024. Antioxidant, hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Choerospondias axillaris* polysaccharide *in vitro* [J]. Food Research and Development, 45(3): 59-66. [李景恩，董金娇，谢美珍，等，2024. 南酸枣多糖的体外抗氧化、降血糖与降血脂作用 [J]. 食品研究与开发，45(3)：59-66.]

LIANG X, WU Z, GUO L, et al., 2022. Late Miocene leaves and endocarps of *Choerospondias* (Anacardiaceae) from Zhejiang, eastern China: implications for paleogeography and paleoclimate [J]. Biology, 11(10): 1399-1399.

LI D, WU NS, GUO CL, et al., 2020. Investigation on the pest species of Lapsi *Choerospondias axillaris* (II): Wood-boring pests and shoot pests [J]. Biological Disaster Science, 43(3): 239-243. [李冬，吴南生，郭春兰，等，2020. 南酸枣主要害虫种类的调查与防治(II)：蛀干与枝梢害虫 [J]. 生物灾害科学，43(3)：239-243.]

LUKASHIN AV, BORODOVSKY M, 1998. GeneMark.hmn'l: new solutions for gene finding [J]. Nucleic Acids Research, 26(4): 1107-1115.

LIU K, MUSE SV, 2005. Power Marker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis [J]. Bioinformatics, 21(9): 2128-2129.

LUO C, WU HX, YAO QS, et al., 2015. Data mining and primer screening of simple sequence repeats in mango transcriptome [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 36(7): 1261-1266. [罗纯，武红霞，姚全胜，等，2015. 芒果转录组中 SSR 位点信息分析与引物筛选 [J]. 热带作物学报，36(7)：1261-1266.]

MAI KL, ZHU CS, FENG LX, et al., 2022. Early performances of *Toona sinensis* and *Choerospondias axillaris* among different provenances from northwestern Guangxi, China [J]. Guangxi Forestry Science, 51(2): 236-240. [买凯乐，朱昌叁，冯立新，等，2022. 桂西北不同种源香椿、南酸枣早期表现 [J]. 广西林业科学，51(2)：236-240.]

MAGURRAN AE, 1988. Ecological diversity and its measurement [M]. Dordrecht: Springer: 179.

PAN LQ, LI JY, LI SC, et al., 2019. Development of SSR markers based on transcriptome of *Camellia japonica* and analysis of genetic relationship [J]. Journal of Beijing Forestry University, 41(7):111-120. [潘丽芹，李纪元，李绍翠， 等， 2019. 基于山茶转录组的 SSR 标记开发及亲缘关系分析 [J]. 北京林业大学学报，41(7)：111-120.]

PEAKALL R, SMOUSE PE, 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update [J]. Bioinformatics, 28(19): 2537-2539.

REN Z, BAI Q, SU SC, et al., 2022. Genetic diversity analysis of *Pistacia chinensis* bunge based on SSR markers [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 42(9): 1530-1539. [任重，白倩，苏淑钗，2022. 基于 SSR 分子标记的中国黄连木遗传多样性分析 [J]. 西北植物学报，42(9)：1530-1539.]

ROZEN SG, SKALETSKY H, 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers [J]. Methods in Molecular Biology, 132: 365-386.

SU YJ, WEI WY, XIE A, et al., 2023. Quality standard of *Choerospondias* cortex [J]. China Pharmaceuticals, 32(08):73-76. [苏永精，韦雯怡，谢澳，等，2023. 南酸枣树皮药材质量标准定性研究 [J]. 中国药业，32(8): 73-76.]

SUN RX, 2017. Genetic diversity and phylogeography of *Liquidambar formosana* Hance in China [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry. [孙荣喜, 2017. 中国枫香树遗传多样性及谱系地理研究 [D]. 北京：中国林业科学研究院.]

TEMNYKH S, PARK WD, AYRES N, et al., 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequence in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 100(5): 697-712.

UNAMBA C, AKSHAY N, SHARMA RK, 2015. Next generation sequencing technologies: the doorway to the unexplored genomics of non-model plants [J]. Frontiers in Plant Science, 6: 1074.

WU SQ, ZHANG JX, HONG XG, et al., 2001. Advance in molecular marker's technology and its applocation [J]. Chinese High Technology Letters(4): 99-103. [吴谡琦，张进兴，洪旭光，等，2001. 分子标记技术的进展及其应用 [J]. 高技术通讯(4)：99-103.]

WU ZL, 2023. Taxonomic identification and paleogeographic migration of the late miocene anacardiaceae from eastern Zhejiang and comparative study of monsoon intensity [D]. Chang'an: Chang'an University. [吴泽玲，2023. 浙东晚中新世漆树科分类鉴定与古地理迁移以及季风强度对比研究 [D]. 长安：长安大学.]

WANG JW, DUAN LY, DAI GL, et al., 2022. Exploiting and primer design of SSR loci based on the transcriptome of *Lycium* Berry [J/OL]. Molecular Plant Breeding, 1-19[2024-12-13]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20221208.1526.003.html. [王佳伟，段林渊，戴国礼，等，2022. 基于枸杞果实转录组 SSR 位点的开发与引物设计 [J/OL]. 分子植物育种，1-19[2024-12-13]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20221208.1526.003.html.]

WANG ZX, HERRERA F, SHU JW, et al., 2020. A new *Choerospondias* (Anacardiaceae) endocarp from the middle miocene of southeast China and its paleoecological implications [J].

Review of Palaeobotany and Palynology, 283: 104312.

YANG GL, ZHONG CL, ZHANG Q, et al., 2022. Optimization of extraction of total flavonoids from *Choerospondias axillaris* leaves by response surface methodology and analysis of antioxidant activity [J]. Cereals & Oils, 35(9): 133-137. [杨观兰，钟朝玲，张强，等，2022. 响应面优化南酸枣叶总黄酮的提取及其抗氧化活性研究 [J]. 粮食与油脂，35(9)：133-137.]

YE XM, CHEN FS, SUN RX, et al., 2019. Prediction of potential suitable distribution areas for *Choerospondias axillaris* besed on MaxEnt model [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 41(3): 440-446. [叶学敏，陈伏生，孙荣喜，等，2019. 基于 MaxEnt 模型的南酸枣潜在适生区预测 [J]. 江西农业大学学报，41(3)：440-446.]

YAO YP, ZHAO L, HE WC, et al., 2021. A study on geographic variation of *Choerospondias axillaris* fruit phenotype characters and germination [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 43(5): 996-1006. [尧云萍，赵兰，何万存，等，2021. 南酸枣果实表型性状及发芽率地理变异研究 [J]. 江西农业大学学报，43(5)：996-1006.]

YE JS, LI WH, GONG B, et al., 2015. Establishment and optimization of ISSR-PCR system for *Choerospondias axillaris* [J]. South China Forestry Science, 43(2): 6-9. [叶金山，李万和，龚斌，等，2015. 南酸枣 ISSR-PCR 反应体系的建立及优化 [J]. 南方林业科学，43(2)：6-9.]

YANG CX, LI KQ, DING W, et al., 2018. Transcriptome analysis of *Choerospondias axillaris* based on high-throughput sequencing [J]. Molecular Plant Breeding, 16(6): 1798-1806. [杨春霞，李康琴，丁伟，等，2018. 基于高通量测序的南酸枣转录组分析 [J]. 分子植物育种，16(6)：1798-1806.]

YAN MM, DAI XG, LI SX, et al., 2011. Sequence analysis and comparison of EST-SSRs in Pine, poplar and eucalyptus [J]. Genomics and Applied Biology, 30(1):103-109. [阎毛毛，戴晓港，李淑娴，等，2011. 松树、杨树及桉树表达基因序列微卫星比对分析 [J]. 基因组学与应用生物学，30(1)：103-109.]

ZHANG Q, LU LX, ZHENG YF, et al., 2022. Isolation, purification, and antioxidant activities of polysaccharides from *Choerospondias axillaris* leaves [J]. Molecules, 27(24): 8881.

ZHANG K, ZHANG X, WANG Q, et al., 2021. The complete chloroplast genome of *Choerospondias axillaris* (Roxb.) B. L. Burtt et A. W. Hill, an ancient and versatile plant [J]. Mitochondrial DNA Part B: Resources, 6(8): 2400-2401.

ZHONG XR, XU MY, LI T, et al., 2023. Development of EST-SSRs based on the transcriptome of *Castanopsis carlesii* and cross-species transfer ability in other *Castanopsis* species [J]. PLoS ONE, 18(7): e288999.

ZHENG TT, WEI WL, YANG X, et al., 2015. Development of SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of *Eriobotrya japonica* [J]. Subtropical Plant Science, 44(4): 274-278. [郑婷婷，魏伟淋，杨向晖，等，2015. 基于枇杷转录组序列的 SSR 分子标记引物开发 [J]. 亚热带植物科学，44(4)：274-278.]

ZALAPA JE, CUEVAS H, ZHU HY, et al., 2012. Using next-generation sequencing approaches to

isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences [J]. American Journal of Botany, 99(2): 193-208.
ZHANG SW, LIANG SM, ZHENG XL, et al., 2019. Development of genomic SSR and application in Chinese bayberry [J]. Acta Horticulturae Sinica, 46(1): 149-156. [张淑文，梁森苗，郑锡良，等，2019. 杨梅基因组 SSR 引物的开发与应用 [J]. 园艺学报，46(1)：149-156.]
ZHANG TT, ZHANG HS, SONG KJ, et al., 2023. Analysis of SSR site characteristics of *Trifolium repens* transcriptome and primer development [J]. Pratacultural Science, 40(9): 2266-2275. [张婷婷，张鹤山，宋康杰，等，2023. 白三叶转录组 SSR 位点特征分析及引物开发 [J]. 草业科学，40(9)：2266-2275.]
ZHANG SS, YAO J, YIN Q, et al., 2022. Development and identification of SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of *Platanus acerifolia* [J]. Molecular Plant Breeding, 20(3): 919-925. [张思思，姚军，尹秋，等，2022. 基于悬铃木转录组测序的 SSR 分子标记开发及鉴定 [J]. 分子植物育种，20(3)：919-925.]
ZHANG PZ, DREISIGACKER S, MELCHINGER AE, et al., 2005. Quantifying novel sequence variation and selective advantage in synthetic hexaploid wheats and their backcross-derived lines using SSR markers [J]. Molecular Breeding, 15(1): 1-10.